



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 199 15 867 A 1**

⑤1 Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**C 07 H 19/02**  
C 07 H 21/00

⑦1 Aktenzeichen: 199 15 867.3  
⑦2 Anmeldetag: 8. 4. 1999  
④3 Offenlegungstag: 19. 10. 2000

DE 199 15 867 A 1

⑦1 Anmelder:  
Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des  
öffentlichen Rechts, 69120 Heidelberg, DE

⑦4 Vertreter:  
Patentanwälte Dr. Bernard Huber, Dr. Andrea  
Schüßler, 81825 München

⑦2 Erfinder:  
Beier, Markus, 69120 Heidelberg, DE; Hoheisel,  
Jörg, 69168 Wiesloch, DE

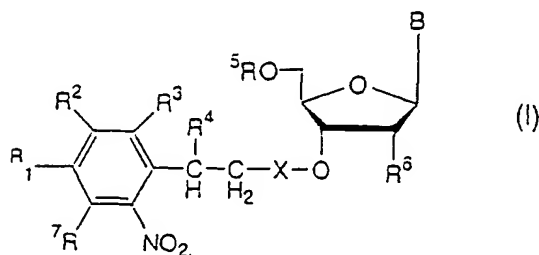
⑤5 Entgegenhaltungen:  
DE 36 06 394 A1  
US 58 43 655  
US 56 23 068  
Nucleosides & Nucleotides 17(1998)1987-1996;  
J.Amer.Chem.Soc. 119(1997)7388-7389;  
Tibtech 14(1996)69-73;  
Tetrahedron Ltd. 32(1991)1511-1514;  
Die Makromolekulare Chemie 176(1975)609-627;

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Nucleosid-Derivate mit photolabilen Schutzgruppen

⑤7 Die vorliegende Erfindung betrifft Nucleosid-Derivate  
mit photolabilen Schutzgruppen der allgemeinen Formel  
(I)



gruppe mit 1 bis 4 C-Atomen oder ein Arylrest  
X = SO<sub>2</sub>, OCO, OCS

B = H, Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin, Uracil, 2,6-Dia-  
minopurin-9-yl, Hypoxanthin-9-yl, 5-Methylcytosin-1-yl,  
5-Amino-4-Imidazolcarbonsäure-1-yl oder 5-Amino-  
4-Imidazolcarbonsäureamid-3-yl, wobei im Falle von B =  
Adenin, Cytosin oder Guanin die primäre Aminofunktion  
ggf. eine permanente Schutzgruppe aufweist bzw. Thy-  
min oder Uracil an der O4-Position ggf. eine permanente  
Schutzgruppe aufweist.

Weiter betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung  
dieser Nucleoside, deren Verwendung und daraus aufge-  
baute Nucleinsäure-Chips.

mit  
R<sup>1</sup> = H, NO<sub>2</sub>, CN, OCH<sub>3</sub>, Halogen, Alkyl-, Alkoxy- oder Al-  
koxyalkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen  
R<sup>2</sup> = H, OCH<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, CN, Halogen, Alkoxy-, Alkoxyalkyl-  
oder Alkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen oder ein Arylrest  
R<sup>3</sup> = H, Halogen, NO<sub>2</sub>, CN, Alkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen  
oder Arylrest oder aliphatischer Arylrest mit 2 bis 5 C-At-  
omen  
R<sup>4</sup> = H, Halogen, OCH<sub>3</sub>, CN, NO<sub>2</sub>, Alkoxy-, Alkoxyalkyl-  
oder Alkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen oder Arylrest  
R<sup>5</sup> = H oder eine bei der Herstellung von Oligonukleotiden  
übliche Schutzgruppe  
R<sup>6</sup> = H, OH, Halogen, Alkoxy- oder Alkoxyalkylrest mit 1  
bis 4 C-Atomen oder XR<sup>8</sup>, wobei X = O oder S und R<sup>8</sup> =  
eine in der Nukleotidchemie übliche Schutzgruppe  
R<sup>7</sup> = H, NO<sub>2</sub>, CN, OCH<sub>3</sub>, Halogen, Alkyl- oder Alkoxyalkyl-

DE 199 15 867 A 1

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Nucleosid-Derivate mit photolabilen Schutzgruppen, Verfahren zu deren Herstellung, deren Verwendung sowie daraus aufgebaute Nucleinsäure-Chips.

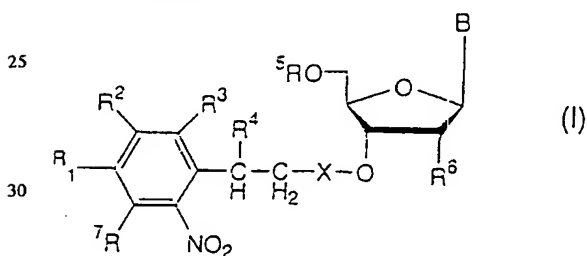
- 5 Photolabile Schutzgruppen für die Hydroxy- und Phosphatfunktionen in Nucleosiden bzw. Nucleotiden sind von Bedeutung, da sie sich für die lichtgesteuerte Parallel-Synthese von Oligonukleotiden auf einer soliden Trägeroberfläche eignen (Fodor et al., Science 1991, 251, S. 767 ff.). Hiermit können Oligonukleotide oder Nukleinsäure-Chips aufgebaut werden, die für eine effiziente Sequenzierung von Nukleinsäuren eingesetzt werden können.

- 10 Bislang sind einzig photolithografische Herstellungsverfahren von DNA-Chips unter Verwendung von 3'-O-Phosphit-  
tamiden, die entsprechend die temporäre photolabile Schutzgruppe an der 5'-O-Position aufweisen, bekannt (WO-A-96/18634). Unter Verwendung dieser Nucleinsäurebausteine lassen sich DNA-Chips herstellen, wobei der Aufbau des Oligomers vom 3'- zum 5'-Ende erfolgt. Das fertiggestellte Oligomer ist somit über das 3'-O-Ende an der festen Phase verankert, das 5'-OH-Ende ist frei zugänglich. DNA-Chips, die mit dieser Methode erzeugt wurden, lassen sich für Hybridisierungsexperimente verwenden, aber nicht für bestimmte Enzymreaktionen (z. B. mit der DNA-Polymerase  
15 oder Ligase), die ein freies 3'-OH erfordern.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht deshalb darin, 3'-photolabile Nucleoside und deren Derivate bereitzustellen und mit den daraus gewonnenen 3'-photolabilen Nucleosiden Nukleinsäure-Chips zu generieren, bei denen die über die lichtgesteuerte Synthese aufgebauten Oligomeren über das 5'-Ende an die feste Phase gekoppelt sind und somit Enzymreaktionen am 3'-Ende möglich machen.

- 20 Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch die Nucleosid-Derivate der allgemeinen Formel (I) entsprechend Patentanspruch 1 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Unteransprüchen.

Erfindungsgemäße Nucleosid-Derivate haben folgende Formel:



mit

- 35  $R^1$  = H, NO<sub>2</sub>, CN, OCH<sub>3</sub>, Halogen, Alkyl-, Alkoxy- oder Alkoxyalkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen  
 $R^2$  = H, OCH<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, CN, Halogen, Alkoxy-, Alkoxyalkyl- oder Alkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen oder ein Arylrest  
 $R^3$  = H, Halogen, NO<sub>2</sub>, CN, Alkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen oder Arylrest oder aliphatischer Acylrest mit 2 bis 5 C-Atomen  
 $R^4$  = H, Halogen, OCH<sub>3</sub>, CN, NO<sub>2</sub>, Alkoxy-, Alkoxyalkyl- oder Alkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen oder Arylrest  
40  $R^5$  = H oder eine bei der Herstellung von Oligonukleotiden übliche Schutzgruppe  
 $R^6$  = H, OH, Halogen, Alkoxy- oder Alkoxyalkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen oder XR<sup>8</sup>, wobei X = O oder S und R<sup>8</sup> = eine in der Nukleotidchemie übliche Schutzgruppe  
 $R^7$  = H, NO<sub>2</sub>, CN, OCH<sub>3</sub>, Halogen, Alkyl- oder Alkoxyalkylgruppe mit 1 bis 4 C-Atomen oder ein Arylrest  
X = SO<sub>2</sub>, OCO, OCS

- 45 B = H, Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin, Uracil, 2,6-Diaminopurin-9-yl, Hypoxanthin-9-yl, 5-Methylcytosin-1-yl, 5-Amino-4-Imidazolcarbonsäure-1-yl oder 5-Amino-4-Imidazolcarbonsäureamid-3-yl, wobei im Falle von B = Adenin, Cytosin oder Guanin die primäre Aminofunktion ggf. eine permanente Schutzgruppe aufweist bzw. Thymin oder Uracil an der O<sup>4</sup>-Position ggf. eine permanente Schutzgruppe aufweist.

- Die Alkyl-, Alkoxy- oder Alkoxyalkylgruppe der Reste  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  und  $R^7$  kann linear oder verzweigt sein, substituiert (insbesondere mit einem oder mehreren Halogenatomen) oder unsubstituiert sowie gesättigt oder ungesättigt sein. Analoges gilt für die Arylgruppe der Reste  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$  oder  $R^7$  bzw. den Acylrest des Rests  $R^3$ .

Vorzugsweise stellt  $R^4$  H oder einen Methylrest dar. Im Falle von  $R^4 \neq$  H sind die Substituenten  $R^1$ – $R^3$  am Phenylring vorzugsweise Wasserstoffreste. Außerdem stellt im Falle von  $R^2$  = OCH<sub>3</sub>  $R^3$  vorzugsweise einen Wasserstoffrest dar.

- 50 In der Position  $R^5$  bedeutet "eine bei der Herstellung von Oligonukleotiden übliche Schutzgruppe" beispielsweise eine Phosphitamid-Gruppe, wie p-NC-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-P-N(Q)<sub>2</sub>, p-NC-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-P-N(Q)<sub>2</sub>, p-NO<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-P-N(Q)<sub>2</sub> oder CH<sub>2</sub> = CH-CH<sub>2</sub>-O-P-N(Q)<sub>2</sub>, wobei die Q-Gruppen gleich oder verschieden sein können und lineare oder verzweigte Alkylreste mit 1 bis 4 C-Atomen, vorzugsweise Ethyl- oder Isopropylreste, bedeuten.

- 55 In der Position  $R^6$  bedeutet "eine in der Nukleotidchemie übliche Schutzgruppe" (= R<sup>8</sup>) insbesondere H sowie die üblichen Alkyl-, Alkenyl-, Acetal- oder Silylether-Schutzgruppen. Bevorzugte Schutzgruppen sind Methyl- oder Ethylreste, Allylreste, Tetrahydropyranyl- bzw. Methoxytetrahydropyranyl-Reste sowie t-Butyldimethylsilyl-Reste.

- 60 Die an den Basen B ggf. permanent vorkommenden Schutzgruppen basieren vorzugsweise auf Acyl-Schutzgruppen. Bevorzugt sind vor allem Phenoxyacetyl-, tert-Butylphenoxyacetyl-, Isobutyryl-, Acetyl-, Benzoyl-, Allyl-, Phthaloyl-, Dansylethoxycarbonyl-, 2-(4-Nitrophenyl)ethoxycarbonyl- oder Dimethylformamidino-Reste. Im Falle von Adenin, Cytosin und Guanin handelt es sich vorzugsweise um Phenoxyacetyl-, tert-Butylphenoxyacetyl-, Acetyl- oder 2-(4-Nitrophenyl)ethoxycarbonyl-Gruppen zum Schutz der exocyclischen Aminofunktionen. Die O<sup>6</sup>-Position von Guanin kann ggf. durch eine Schutzgruppe wie 2-(4-Nitrophenylsulfonyl)ethyl- oder 2-(4-Nitrophenyl)ethyl- geschützt sein. Ebenso kann die O<sup>4</sup>-Position von Thymin oder Uracil eine Schutzgruppe wie 2-(4-Nitrophenylsulfonyl)ethyl- oder 2-(4-Nitrophenyl)ethyl- aufweisen.

Halogen bedeutet erfindungsgemäß F, Cl, Br, I, wobei die drei erstgenannten bevorzugt sind.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Nucleosid-Derivate ist beispielhaft in Fig. 2 gezeigt, worauf nachfolgend Bezug genommen wird. Die Erwähnung von bestimmten Halogen- und Alkylsubstitutionen schließt immer gleichwirkende Äquivalente ein, z. B. "Chlor-" schließt nicht aus, daß auch die entsprechenden Fluor- oder Bromverbindungen einsetzbar sind. Ebenso gilt für "Methyl-", das auch die entsprechenden anderen Niederalkylverbindungen, wie Ethyl-, Propyl- oder Butyl mit einschließt. Die Reste  $R^1$ ,  $R^2$ ,  $R^3$ ,  $R^4$ ,  $R^6$ ,  $R^7$  und X haben die oben genannten Bedeutungen.

Die Herstellung beginnt mit der Präparation eines Acylierungsreagenzes. Hierzu wird auf Fig. 1 verwiesen. Ausgegangen wird hierfür bevorzugt von einem Chlorkohlensäureester (II, mit  $X = OCO$ ), der sich beispielsweise gemäß der Vorschrift in WO-A-96/18634 oder gemäß nachfolgendem Beispiel 1 erhalten läßt. Analog ist ein gewünschter Chlorthiokohlensäureester (II, mit  $X = OCS$ ) über die analoge Umsetzung mit Thiophosgen zugänglich. Das Acylierungsreagenz (IV) wird dann durch Umsetzung des Chlorkohlensäureesters (II, mit  $X = OCO$ ) oder des Chlorthiokohlensäureesters (II, mit  $X = OCS$ ) oder ein entsprechendes Sulfonylchlorid-Derivat (II,  $X = SO_2$ ) mit einer Verbindung (III), vorzugsweise N-Methylimidazol, generiert. Diese Reaktionen werden in einem polaren organischen Lösungsmittel, vorzugsweise Dichlormethan, bei Temperaturen zwischen  $-10^\circ C$  und  $+10^\circ C$ , vorzugsweise bei  $0^\circ C$ , durchgeführt. Vorzugsweise wird der Reaktion Molekularsieb zugesetzt und mit einem Überschuß an Verbindung (III), bevorzugt N-Methylimidazol, in bezug auf die eingesetzte Verbindung (II) gearbeitet: 1–10 Äquivalente, bevorzugt 2–5 Äquivalente. Alternativ zu N-Methylimidazol kann die Generation des Acylierungsreagenzes auch mittels anderer heterocyclischer Verbindungen (III), wie Pyridin, 4-N,N-Dimethylaminopyridin (DMAP), Triazol, Tetrazol oder Imidazol verlaufen.

Alternativ ist das Acylierungsreagenz (IV,  $Z = \text{triflat}$ ) ausgehend von N,N-Carbonyldiimidazol (V,  $Y = CO$ ) oder N,N-Thiocarbonyldiimidazol (V,  $Y = CS$ ) nach Methylierung mit einem Methylierungsreagenz (VI), vorzugsweise Trifluormethansulfonsäuremethylester, und Umsetzung mit dem entsprechenden Alkohol (VIII) zugänglich. Hierbei wird die Reaktion bevorzugt in einem polaren organischen Lösungsmittel, vorzugsweise in Nitromethan oder einem Gemisch von Nitromethan und Dichlormethan, bei Temperaturen zwischen  $-10$  und  $+10^\circ C$ , vorzugsweise  $0^\circ C$ , durchgeführt. Die Methylierung von (V) erfolgt beispielsweise gemäß Rapoport et al., J. Am. Chem. Soc. 1989, 111, S. 4856–4859. Nach erfolgter Methylierung wird der entsprechende Alkohol (VIII) zugesetzt und somit das Acylierungsmittel vom Imidazoliumentyp (IV,  $Z = \text{triflat}$ ) in Form eines Triflatsalzes generiert. Werden bei der Methylierung von (V) als Methylierungsreagenz (VI) Methyljodid oder Meerweinsalze eingesetzt, können die Acylierungsreagenzien (IV) entsprechend in Form ihrer Iodid oder Tetrafluoroborat-Salze erzeugt werden. Die Umsetzung von Verbindung (V) mit dem entsprechenden Methylierungsmittel erfolgt vorzugsweise im Verhältnis 1 : 1 bis 1 : 10, bevorzugt im Verhältnis 1 : 2. Die Umsetzung der methylierten Form (VI) mit dem entsprechenden Alkohol (VIII) erfolgt vorzugsweise im Verhältnis 1 : 1 bis 1 : 10, ganz bevorzugt im Verhältnis 1 : 1 bis 1 : 2.

Das Acylierungsreagenz (IV) wird weiter mit einem ggf. geschützten Nucleosid (IX) umgesetzt. 5'-DMTr-geschützte Nucleoside der allgemeinen Formel (IX) sind beispielsweise käuflich erhältlich von den Firmen Prologo, Fluka, Sigma oder Aldrich.

Die Umsetzung des Acylierungsreagenz (IV) mit den geschützten Nucleosiden (IX) erfolgt vorzugsweise in Dichlormethan oder einem Lösungsmittelgemisch aus Dichlormethan und einem polaren organischen Lösungsmittel ggf. in Gegenwart einer Base, wie Pyridin, N-Methylimidazol, 4-N,N-Dimethylaminopyridin, Ethyldiisopropylamin ( $\text{EtN}(\text{i-pr})_2$ ) oder Triethylamin, bei Temperaturen zwischen  $-60$  und  $+25^\circ C$ , bevorzugt  $0^\circ C$ . Als polares organisches Lösungsmittel wird vorzugsweise Dichlorethan, Nitromethan, DMF oder Pyridin eingesetzt. Das Mischungsverhältnis von Dichlormethan zu dem polaren organischen Lösungsmittel unterliegt keiner Beschränkung. Vorzugsweise werden jedoch 1 bis 3 Vol.-Teile Dichlormethan pro Vol.-Teil polarem organischem Lösungsmittel eingesetzt. Bevorzugt wird eine Lösung des Acylierungsreagenz (IV) in Dichlormethan vorgelegt und das Nucleosid (IX), welches ebenso in Dichlormethan gelöst wurde, zutropft. Das Molverhältnis von Acylierungsreagenz zu Nucleosid kann vorzugsweise zwischen 1 : 1 bis 5 : 1, bevorzugt bei 3 : 1, ganz bevorzugt bei 2 : 1 liegen, d. h. das Acylierungsreagenz wird bevorzugt im Überschuß verwendet. Die Konzentration des Nucleosids im Lösungsmittelgemisch unterliegt keiner Beschränkung. Sie liegt jedoch bevorzugt im Bereich von 0,1 bis 3,0 mmol pro 10 ml Lösungsmittel.

Nach erfolgter Umsetzung (bevorzugte Reaktionszeit: 1–12 Std.) kann das erhaltene Nucleosid-Derivat (X) isoliert werden. Danach erfolgt das Abspalten der 5'-Schutzgruppe am Nucleosidbestandteil durch Umsetzen mit bevorzugt Trichloressigsäure oder Toluolsulfonsäure, ggf. mit Camphersulfonsäure oder Dichloressigsäure in Dichlormethan. Es wird das Nucleosid-Derivat (XI) erhalten, das Formel (I) gehorcht.

Falls es gewünscht ist, kann an der 5'-Position des Nucleosid-Derivats (XI) eine Phosphitamid-Gruppe eingeführt werden. Dies geschieht beispielsweise durch die Umsetzung des Nucleosid-Derivats (XI) mit Bis(diisopropylamino)( $\beta$ -cyanoethoxy)phosphin unter Zusatz eines leicht aciden Katalysators (beispielsweise Tetrazol, Pyridin-Hydrochlorid) oder durch Umsetzung des Nucleosidderivats mit Chlor-Diisopropylamino-2-cyanoethoxylphosphin unter Zusatz einer Base (z. B. Diisopropylethylamin, N-Methylmorphin, Lutidin oder Collidin) und einem Lösungsmittel (z. B. THF). Dabei entsteht Verbindung (XII).

Der Vorteil die Umsetzung des geschützten Nucleosids mit einem milden Acylierungsreagenz durchzuführen, liegt in der Selektivität der Reaktion. Es werden quantitative Acylierungen der 3'-O-Position des Nucleosidbausteins ohne nachteilige Nebenproduktformation erhalten. Werden hierzu reaktivere Acylierungsreagenzien, wie z. B. der Chlorkohlensäureester selbst, verwendet, tritt eine unkontrollierte Reaktion ein. Es werden eine große Anzahl von Nebenprodukten gebildet, d. h. es besteht hierbei keinerlei Selektivität für das gewünschte 3-monoacylierte Produkt. In einer ganz besonders bevorzugten Ausführungsform wird das geschützte Nucleosid mit dem Acylierungsreagenz unter Zusatz von Molekularsieb durchgeführt. Mit Molekularsieb ist eine Steigerung der Selektivität für das gewünschte 3'-monoacylierte Produkt zu beobachten.

Die erfindungsgemäßen 3'-photolabilen Nucleoside können bei der photolithografischen Nukleinsäurechip-Synthese eingesetzt werden. Verfahren hierzu sind dem Fachmann ausreichend bekannt (z. B. Fodor et al., s. o.). Ein geeignetes Verfahren hierzu ist beispielsweise auch in der deutschen Anmeldung DE 198 58 440.7 gezeigt. Dort wird zwar ein Verfahren gezeigt, das von 5'-photolabilen Nucleosiden ausgeht, aber die dort gezeigte Methodik läßt sich auf die Verwen-

derung von 3'-photolabilen 5'-Phosphitamidin analog übertragen. Bei diesem Verfahren wird der bei der Chip-Synthese übliche Bestrahlungsschritt in Anwesenheit einer Base durchgeführt. Dieses Verfahren zur photolithographischen Biochip-Synthese bietet den Vorteil, daß eine effiziente Abspaltung von photolabilen Schutzgruppen stattfindet.

Unter einem Nucleinsäurechip sollen erfindungsgemäß auf einem Träger aufgebaute Biomoleküle, wie DNA oder RNA, sowie Nucleinsäureanaloge, wie PNA, LNA oder Chimären von diesen mit DNA, RNA oder untereinander verstanden werden.

Erfindungsgemäß ist jegliche(r) auf diesem Gebiet übliche Träger bzw. Matrix bei der Nucleinsäurechip-Herstellung einsetzbar. Dies sind insbesondere Glas, Folien bzw. Membranen aus Polypropylen, Nylon, Cellulose, Cellulosederivate (z. B. Celluloseacetat, Cellulose-Mischester), Polyethersulfonen, Polyamiden, Polyvinylchlorid, Polyvinylidenfluorid, Polyester, Teflon oder Polyethylen. Die Trägeroberflächen können auch mit freien oder geschützten funktionellen Gruppen versehen sein, z. B. eine Amino-Gruppe, Hydroxyl-Gruppe, Carboxyl-Gruppe, Carbonyl-Gruppe, Thiol-, Amid- oder Phosphat-Gruppe tragen. In einer bevorzugten Ausführungsform weisen die Trägeroberflächen eine Derivatisierung gemäß der deutschen Patentanmeldung 198 53 242.3 auf.

Bei dem oben genannten bevorzugten Verfahren zur photolithographischen Biochip-Synthese gemäß der deutschen Anmeldung DE 198 58 440.7 werden die Schritte Kondensation, Oxidation und Capping wie üblich (Fodor et al., Science 1991, 251, S. 767 ff.) durchgeführt. Allerdings findet der erste Schritt der Synthese, nämlich die Bestrahlung, unter Zusatz von Basen, bevorzugt starken Basen, insbesondere nicht-nukleophilen Basen, statt, was in Zusammenwirken mit dem bei der Bestrahlung angewendeten Licht zu einer überraschend effektiven Abspaltung der Schutzgruppen führt. Als Basen eignen sich die dem Fachmann bekannten Basen, wie z. B. DBU (1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en, DBN (1,5-Diazabicyclo[4.3.0]non-5-en, Diisopropylethylamin, Pyridin, Piperidin, Triethylamin, Diisopropylamin, N-Methylmorpholin, 2,6-Lutidin, Collidin, N-Methylimidazol, Dabco, N,N-Dimethylaminopyridin. Die Bestrahlung kann unter den üblichen Bedingungen stattfinden. Die Wellenlänge der Bestrahlung ist von der verwendeten Schutzgruppe abhängig. Die geeigneten Wellenlängen sind dem Fachmann bekannt. Die Menge an während der Bestrahlung anwesender Base variiert zwischen 0,01 M und 1,0 M und ist natürlich von der Basenstärke abhängig. So hat sich es sich bewährt 0,03 bis 1 M (bevorzugt 0,05 bis 0,5 M) DBU in Acetonitril, 0,03 bis 0,8 M (bevorzugt 0,05 M) Diisopropylethylamin in Acetonitril oder 0,03 bis 1 M (bevorzugt 0,05 M) Piperidin in Acetonitril zu verwenden.

Nucleinsäure-Chips, die unter Verwendung erfindungsgemäßer Nucleoside hergestellt worden sind, sind dadurch gekennzeichnet, daß das fertiggestellte Oligomer mit der 5'-Position mit der festen Phase verbunden ist, das 3'-OH aber frei zugänglich ist (vgl. Fig. 3). DNA-Chips, die mit dieser Methode erzeugt wurden, lassen sich sowohl für Hybridisierungsexperimente als auch für bestimmte Enzymreaktionen (z. B. DNA-Polymerase), die ein freies 3'-OH erfordern, verwenden. Somit haben Nucleinsäure-Chips (bevorzugt DNA-Chips), die mit dieser Strategie erzeugt wurden, einen weit größeren Anwendungsbereich, da mit diesen sowohl alle Experimente durchgeführt werden können wie mit den "üblichen" DNA-Chips, aber darüberhinaus noch hochparallel festphasengestützte Enzymreaktionen (z. B. cDNA-Synthese, Ligase-Reaktionen, reverse Transkription, PCR, multiplex-PCR) durchgeführt werden können. Damit erschließen sich neue Anwendungsgebiete (z. B. DNA-Computing, festphasengestützte Sequenzierung).

Die Erfindung wird weiter anhand der nachfolgenden Figuren beschrieben.

Fig. 1 Herstellung eines Acylierungsreagenzes (allgemein)

(a) Herstellung des Acylierungsreagenzes für X = OCO

(b) Herstellung des Acylierungsreagenzes für X = OCS

(c) Herstellung des Acylierungsreagenzes für X = SO<sub>2</sub>

Fig. 2 Allgemeiner Synthesepfad erfindungsgemäßer 3'-photolabiler Nucleosid-Derivate

Fig. 3-6 Synthesepfade der Verbindungen gemäß der Beispiele 1-6

Fig. 7 Aufbau eines Oligonukleotids unter Verwendung 3'-photolabiler 5'-Phosphitamide

Fig. 8 Bio-Chip mit d(T<sub>9</sub>), hergestellt unter Verwendung von 3'-O-[2-(2-Nitrophenyl)-propoxycarbonyl]thymidin-5'-O-[2-cyanoethyl]-N,N-diisopropylphosphoramidit]

Fig. 9 DNA-Chip-Syntheseprozess

Die Erfindung wird weiter anhand der nachfolgenden Beispiele beschrieben. Die Reaktionsschemata zur Herstellung der nachfolgenden Verbindungen sind in den Fig. 3-6 gezeigt, worauf nachfolgend Bezug genommen wird.

#### Beispiel 1

##### 2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonylchlorid (2)

Zu 5 ml Diphosgen (41,4 mmol) in 10 ml absolutem THF werden unter Stickstoffatmosphäre bei 0°C über eine Kanüle eine Lösung bestehend aus 7,2 g 2-(2-Nitrophenyl)propanol (39,9 mmol) und 4,4 ml N-Methylmorpholin (39,7 mmol) in 15 ml absolutem THF langsam zugegeben. Nach 1 Std. Rühren bei 0°C wird vom gebildeten Niederschlag abgesaugt und das Filtrat am Hochvakuum abgezogen. Man erhält 6,91 g von (2) in Form eines braunes Öls (71%).

#### Beispiel 2

##### 1-Methyl-3[2-(2-nitrophenyl)propoxycarbonyl]imidazoliumchlorid (3)

Unter Stickstoff und unter Ausschluß von Licht werden bei 0°C zu 0,8 ml N-Methylimidazol (12,66 mol) und Molekularsieb 4 Å in 20 ml absolutem Dichlormethan 0,55 ml 2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonylchlorid (2) (5 mmol) zugegeben. Die Reaktionslösung wird 15 Minuten bei 0°C gerührt. Diese Reaktionslösung wird direkt für Acylierungen eingesetzt.

## Beispiel 3

## 1-Methyl-3-[2(2-nitrophenyl)propoxycarbonyl]imidazoliumtriflat (4)

Unter Stickstoffatmosphäre werden 2,19 g N,N-Carbonyldiimidazol (13,5 mmol) in 40 ml absolutem Dichlormethan und 10 ml absolutem Nitromethan gelöst und auf 0°C gekühlt. Es werden 3 ml Trifluormethansulfonsäuremethylester (27 mmol) zugegeben und bei 0°C gerührt. Nach 30 Min. wird eine Lösung, bestehend aus 1,22 g 2-(2-Nitrophenyl)propanol (6,75 mmol) in 10 ml absolutem Dichlormethan zugegeben. Die Reaktionslösung kann nach 1 Std. Reaktionszeit direkt für Acylierungen eingesetzt werden.

## Beispiel 4

## 3'-O-[2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl]thymidin (7)

1,088 g 5'-O-Dimethoxytrityl-thymidin ((5), 2 mmol; Fa. Proligo, Hamburg) werden unter Stickstoffatmosphäre und unter Ausschluß von Licht zu einer 1-Methyl-3-[2-(2-nitrophenyl)propoxycarbonyl]imidazoliumchlorid-Acylierungsreaktion (3) (hergestellt aus 0,55 ml 2-[2-Nitrophenyl]propoxycarbonylchlorid (4,9 mmol), 0,8 ml N-Methylimidazol (10 mmol) und Molekularsieb 4 Å) zugefügt. Das Reaktionsgemisch wird abgedunkelt über Nacht bei 4°C gelagert. Das Molekularsieb wird abgetrennt und die organische Phase gegen 50 ml gesättigte Natriumbicarbonatlösung extrahiert. Nach Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat wird 100 ml einer 3% Trichloressigsäurelösung in Dichlormethan zugefügt. Die stark rot gefärbte Lösung wird mit 100 ml gesättigter Natriumbicarbonatlösung extrahiert, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und evaporiert. Die Reinigung erfolgt über Säulenchromatografie [30 g SiO<sub>2</sub>; Elution mit Toluol/Ethylacetat (5 : 4, 250 ml), dann Toluol/Ethylacetat/Methanol (5 : 4 : 0,5, 300 ml)]. Die Ausbeute an Verbindung (7) beträgt 781 mg in Form eines weißen Schaumes (87% Ausbeute).

## Beispiel 5

## 3'-O-[2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl]thymidin-5'-O-[2-cyanoethyl)-(N,N-diisopropylamino)phosphoramidit] (9)

Unter Stickstoffatmosphäre werden 449 mg 3'-O-[2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl]thymidin (7) (1 mmol) in 20 ml absolutem Dichlormethan gelöst. Es werden unter Stickstoffatmosphäre und unter Ausschluß von Licht 0,22 ml N-Methylmorpholin (2 mmol) und 0,24 ml (2-Cyanoethyl)-N,N-diisopropylphosphorimidochlorid (8) (1,1 mmol) zugefügt und 30 Minuten gerührt. Es wird gegen 50 ml gesättigte Natriumbicarbonatlösung extrahiert, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und evaporiert. Die Reinigung erfolgt über Säulenchromatografie [10 g SiO<sub>2</sub>; Elution mit Toluol (50 ml), Toluol/Ethylacetat (4 : 1; 50 ml), Toluol/Ethylacetat (3 : 1, 40 ml), Toluol/Ethylacetat (2 : 1, 120 ml)]. Die Ausbeute beträgt 300 mg Verbindung (9) in Form eines weißen Schaumes (46% Ausbeute).

## Beispiel 6

3'-O-[2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl]-N<sup>6</sup>-[(4-(<sup>tert</sup>butyl)phenoxy)-acetyl]-2'-desoxyadenosin (12)

1,0 g 5'-O-Dimethoxytrityl-N<sup>6</sup>-[(4-(<sup>tert</sup>butyl)phenoxy)acetyl]-2'-desoxyadenosin (1,34 mmol) in 20 ml absolutem Dichlormethan werden durch eine Kanüle unter Stickstoffatmosphäre und unter Ausschluß von Licht zu einer 1-Methyl-3-[2-(2-nitrophenyl)propoxycarbonyl]imidazoliumchlorid-Acylierungsreaktion (3) (hergestellt aus 0,30 ml 2-[2-Nitrophenyl]propoxycarbonylchlorid (2,68 mmol), 0,534 ml N-Methylimidazol (6,7 mmol) und Molekularsieb 4 Å) zugefügt. Das Reaktionsgemisch wird abgedunkelt über Nacht bei 4°C gelagert. Das Molekularsieb wird abgetrennt und die organische Phase gegen 50 ml gesättigte Natriumbicarbonatlösung extrahiert. Nach Trocknen der organischen Phase über Natriumsulfat wird diese 30 Min. in einer 1% Toluolsulfonsäurelösung in Dichlormethan/Methanol (4 : 1) gerührt. Die stark rot gefärbte Lösung wird mit 100 ml gesättigter Natriumbicarbonatlösung extrahiert, die organische Phase über Natriumsulfat getrocknet und evaporiert. Die Reinigung erfolgt über Säulenchromatografie [30 g SiO<sub>2</sub>; Elution mit Toluol, dann Toluol/Ethylacetat (4 : 1, 100 ml), (7 : 3, 100 ml), (3,2, 100 ml), (1 : 1, 200 ml), (2 : 3, 200 ml), (3 : 7, 200 ml). Die Ausbeute an Verbindung (12) beträgt 324 mg in Form eines weißen Schaumes (37% Ausbeute).

## Beispiel 7

Herstellung von DNA-Chips mit Hilfe von Phosphoramiditen vom Typ 3'-O-Photoschutzgruppe-5'-Phosphoramidit mittels photolithographischer Techniken

Die DNA-Chip-Synthese wurde analog dem bekannten Verfahren von Fodor et al. (Science 1991, 251, S. 767 ff) auf einer Glasoberfläche als Träger durchgeführt. Hinsichtlich des Bestrahlungsschritts wurde jedoch gemäß der deutschen Patentanmeldung DE 198 58 440.7 verfahren. Der Reaktionsablauf ist schematisch in Fig. 9 gezeigt. Als Nucleosid wurde die erfindungsgemäße Verbindung (9) (3'-O-[2-(2-Nitrophenyl)propoxycarbonyl]thymidin-5'-O-[2-cyanoethyl]-N,N-diisopropylamino)phosphoramidit; s. Beispiel 5) eingesetzt.

Der angewendete Zyklus und die speziellen Synthesebedingungen sind in der deutschen Patentanmeldung DE 198 58 440.7 gezeigt, worauf hier Bezug genommen wird. Das allgemeine Syntheseprinzip ist auch in Fig. 7 gezeigt.

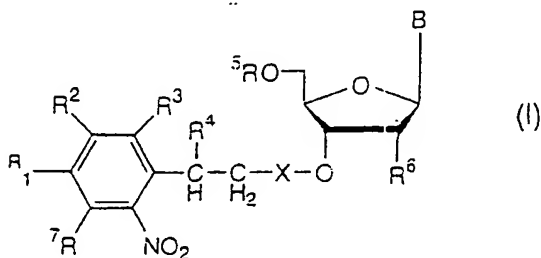
In Fig. 8 ist eine Fluoreszenzanalyse des hergestellten Chips mit d(T<sub>9</sub>) zu sehen. Das Muster entspricht der angewendeten Maske II, d. h. es war eine erfolgreiche DNA-Chip-Synthese möglich.

Dieser Chip hat den Vorteil, daß die Ankopplung des Nucleotidstrangs über das 5'-Ende erfolgt und somit das 3'-Ende

frei verfügbar ist. Dadurch können Enzymreaktionen, die ein freies 3'-Ende verlangen (z. B. PCR, cDNA-Synthese, Ligase-Reaktionen, reverse Transkription, Sequenzierungen, multiplex-PCR usw.) an diesem Bio-Chip durchgeführt werden.

# Patentansprüche

## 1. Nucleosid-Derivate mit photolabilen Schutzgruppen der allgemeinen Formel (I)



mit

$R^1 = \text{H, NO}_2, \text{CN, OCH}_3, \text{Halogen, Alkyl-, Alkoxy- oder Alkoxyalkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen}$

$R^2 = \text{H, OCH}_3, \text{NO}_2, \text{CN, Halogen, Alkoxy-, Alkoxyalkyl- oder Alkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen oder ein Arylrest}$   
 $R^3 = \text{H, Halogen, NO}_2, \text{CN, Alkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen oder Arylrest oder aliphatischer Acylrest mit 2 bis 5 C-Atomen}$

$R^4 = \text{H, Halogen, OCH}_3, \text{CN, NO}_2, \text{Alkoxy-, Alkoxyalkyl- oder Alkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen oder Arylrest}$

$R^5 = \text{H oder eine bei der Herstellung von Oligonukleotiden übliche Schutzgruppe}$

$R^6 = \text{H, OH, Halogen, Alkoxy- oder Alkoxyalkylrest mit 1 bis 4 C-Atomen oder XR}^8$ , wobei  $X = \text{O oder S}$  und  $R^8 =$  eine in der Nukleotidchemie übliche Schutzgruppe

$R^7 = \text{H, NO}_2, \text{CN, OCH}_3, \text{Halogen, Alkyl- oder Alkoxyalkylgruppe mit 1 bis 4 C-Atomen oder ein Arylrest}$

$X = \text{SO}_2, \text{OCO, OCS}$

$B = \text{H, Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin, Uracil, 2,6-Diaminopurin-9-yl, Hypoxanthin-9-yl, 5-Methylcytosin-1-yl, 5-Amino-4-Imidazolcarbonsäure-1-yl oder 5-Amino-4-Imidazolcarbonsäureamid-3-yl}$ , wobei im Falle von  $B =$  Adenin, Cytosin oder Guanin die primäre Aminofunktion ggf. eine permanente Schutzgruppe aufweist bzw. Thymin oder Uracil an der  $O^4$ -Position ggf. eine permanente Schutzgruppe aufweist.

2. Nucleosid-Derivat nach Anspruch 1, wobei im Falle von  $R^4 \neq \text{H}$   $R^1, R^2$  und  $R^3$  jeweils H sind.

3. Nucleosid-Derivat nach Anspruch 1, wobei im Falle von  $R^2 = \text{OCH}_3$   $R^3 = \text{H}$  ist.

4. Nucleosid-Derivat nach einem der Ansprüche 1–3, wobei  $R^4 = \text{CH}_3$  ist.

5. Nucleosid-Derivat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die übliche funktionelle Gruppe zur Herstellung von Oligonukleotiden an der Position  $R^5$  eine Phosphitamidgruppe der Formel

$\text{p-NC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-P-N(Q)}_2$ ,  $\text{p-NC-C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-P-N(Q)}_2$ ,  $\text{p-NO}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-P-N(Q)}_2$  oder  $\text{OH}_2\text{=CH-CH}_2\text{-O-P-N(Q)}_2$  ist,

wobei die Q-Gruppen gleich oder verschieden sein können und lineare oder verzweigte Alkylreste mit 1 bis 4 C-Atomen bedeuten.

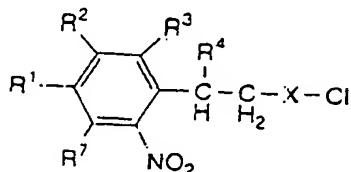
6. Nucleosid-Derivat nach Anspruch 5, wobei die Y-Gruppe Ethyl- oder Isopropyl- ist.

7. Nucleosid-Derivat nach einem der Ansprüche 1–6, wobei der Rest  $R^8$  in der Gruppe  $\text{XR}^8$  an der Position  $R^6$  im Falle von  $X = \text{O}$  eine Alkyl-, Alkenyl-, Acetal- oder Silylether-Gruppe oder im Falle von  $X = \text{S}$  eine Alkyl-Gruppe ist.

8. Nucleosid-Derivat nach Anspruch 7, wobei Halogen F, Cl oder Br bedeutet.

9. Verfahren zur Herstellung von Nucleosid-Derivaten nach einem der Ansprüche 1–8, wobei man

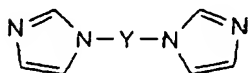
(a1) eine Verbindung der allgemeinen Formel (II)



in der  $R^1, R^2, R^3, R^4, R^7$  und  $X$  die oben genannte Bedeutung haben,

mit N-Methylimidazol, Pyridin, N,N-Dimethylaminopyridin, Triazol oder Tetrazol umgesetzt, oder

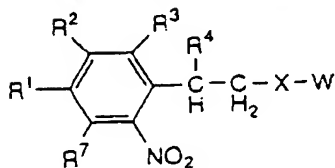
(a2) eine Verbindung der allgemeinen Formel (V)



$Y = \text{C} = \text{O}$  oder  $\text{C} = \text{S}$

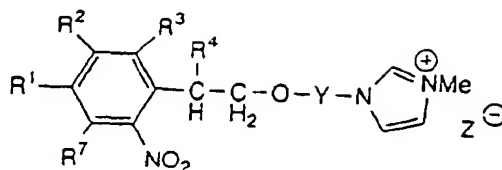
mit einem Methylierungsmittel umgesetzt sowie das erhaltene Produkt mit einem Alkohol reagieren läßt und anschließend

(b) das in Stufe (a1) oder (a2) gebildete Acylierungsreagenz (IV)

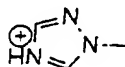
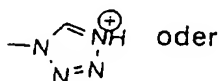
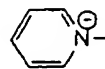
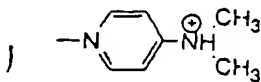
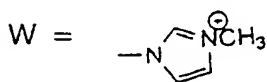


IV (Z=Cl)

$Z^{\ominus}$  oder

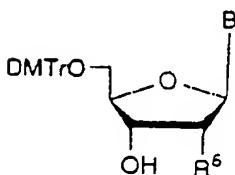


IV (Z=triflat)



Y = C = O oder C = S

mit einem Nucleosid der allgemeinen Formel (IX)



in der  $R^5$ ,  $R^6$  und B die oben angegebene Bedeutung haben, reagieren läßt.

10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei man in der 5'-Stellung der entstandenen Nucleosid-Derivate eine Phosphoramid-Gruppe der Formel

$p\text{-NC-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-P-N(Q)}_2$ ,  $p\text{-NC-C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-P-N(Q)}_2$ ,  $p\text{-NO}_2\text{-C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-P-N(Q)}_2$  oder  $\text{CH}_2=\text{CH-CH}_2\text{-O-P-N(Q)}_2$  ist,

wobei die Q-Gruppen gleich oder verschieden sein können und lineare oder verzweigte Alkylreste mit 1 bis 4 C-Atomen bedeuten, einführt.

11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, wobei man Stufe (a) in einem polaren organischen Lösungsmittel bei Temperaturen zwischen  $-10$  und  $+10^\circ\text{C}$  durchführt.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei das polare Lösungsmittel Dichlormethan ist.

13. Verfahren nach Anspruch 11 oder 12, wobei die Temperatur ca.  $0^\circ\text{C}$  beträgt.

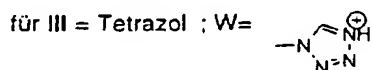
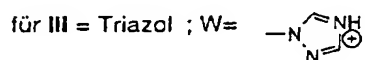
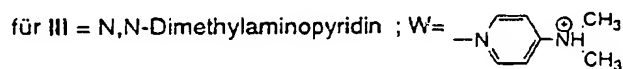
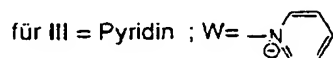
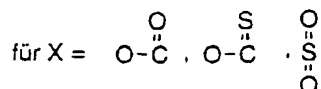
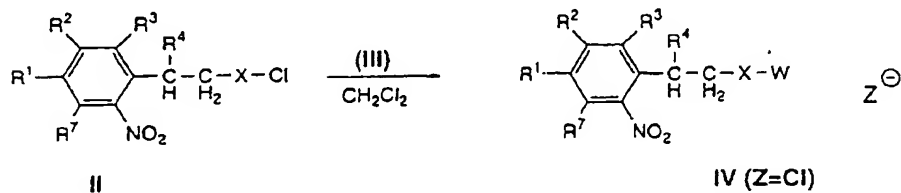
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 9 bis 13, wobei man Stufe (b) in Dichlormethan oder einem Dichlormethan enthaltenden Lösungsmittelgemisch bei Temperaturen von ca.  $0^\circ\text{C}$  durchführt.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14, wobei man in Stufe (b) das in Stufe (a) gebildete Acylierungsmittel in Dichlormethan vorlegt und das Nucleosid zutropft.

17. Verwendung der Nucleosid-Derivate nach einem der Ansprüche 1 bis 8 zum Aufbau von Oligonukleotiden oder Nukleinsäure-Chips.

18. Nukleinsäure-Chip, bei dem die über eine lichtgesteuerte Synthese aufgebauten Oligomeren über das 5'-Ende an die feste Phase gekoppelt sind.

Hierzu 12 Seite(n) Zeichnungen

Herstellung des Acylierungsreagenzes für  $X = \text{SO}_2, \text{OCO}, \text{OCS}$ :

alternativ für  $X = \text{OCO}, \text{OCS}$ :

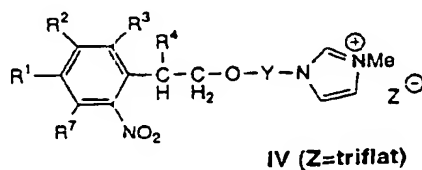
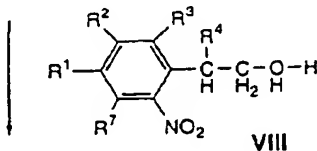
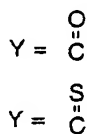
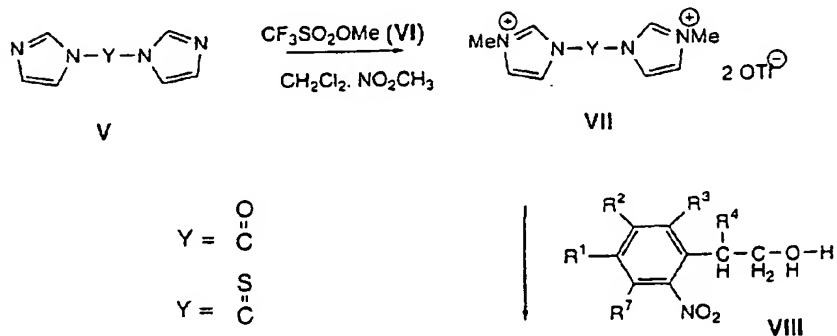
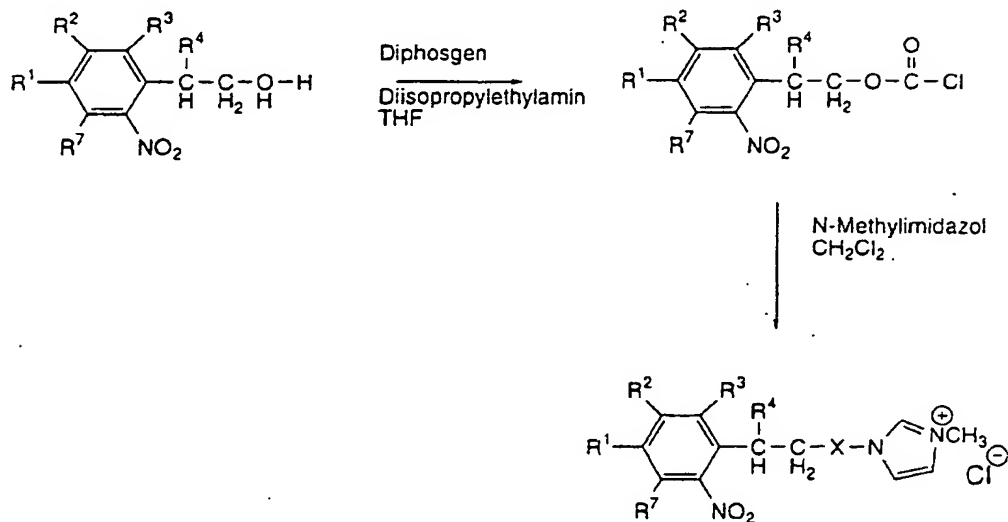


Fig. 1



### Herstellung des Acylierungsreagenzes für X=OCO :



alternativ :

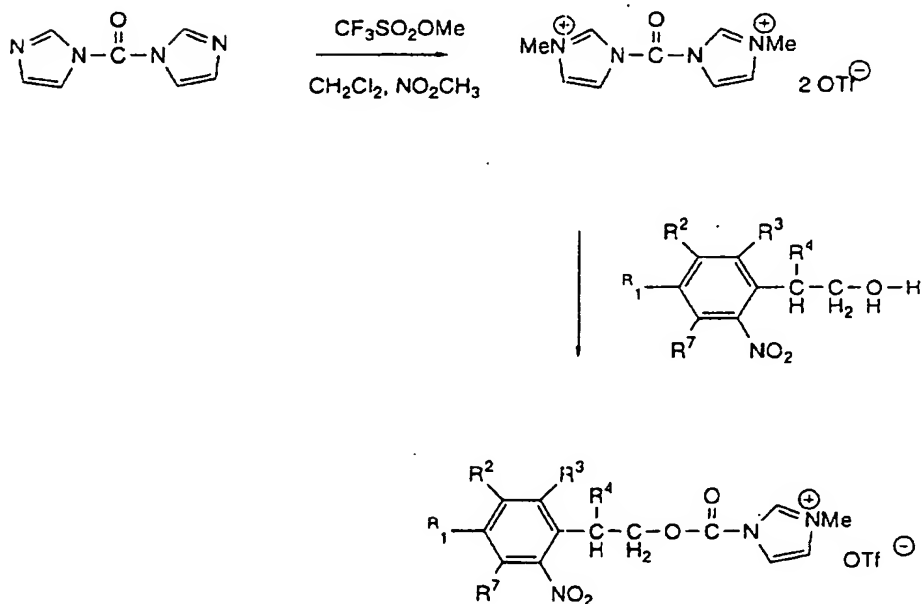


Fig. 1(a)

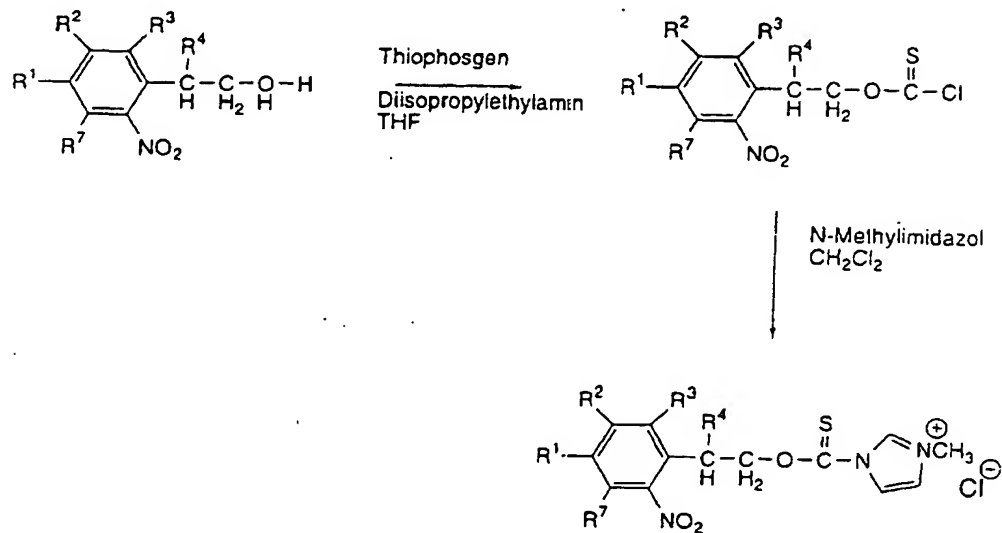
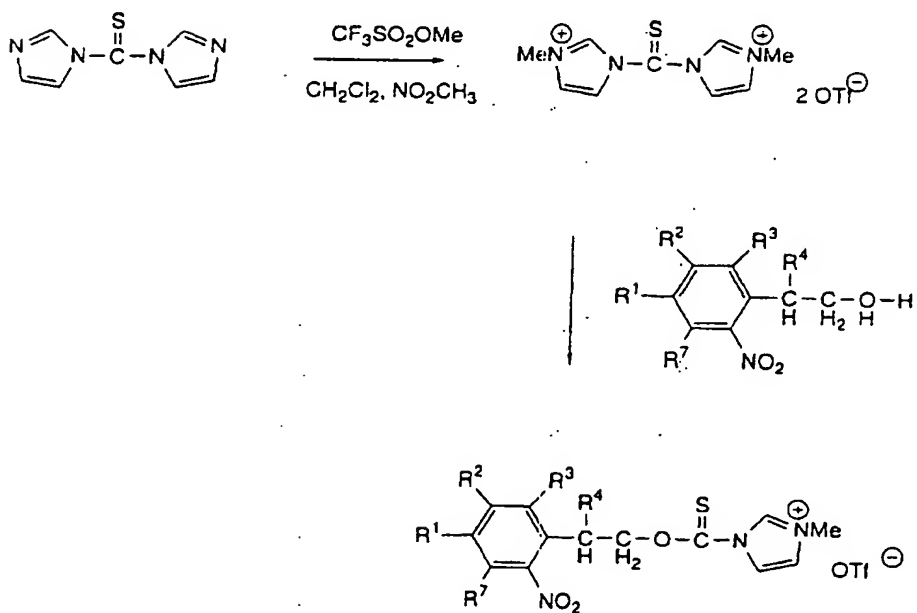
Herstellung des Acylierungsreagenzes für  $X=OCS$  :alternativ :

Fig. 1(b)

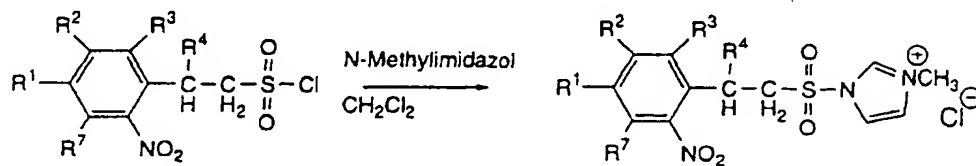
Herstellung des Acylierungsreagenzes für  $X=SO_2$  :

Fig. 1(c)

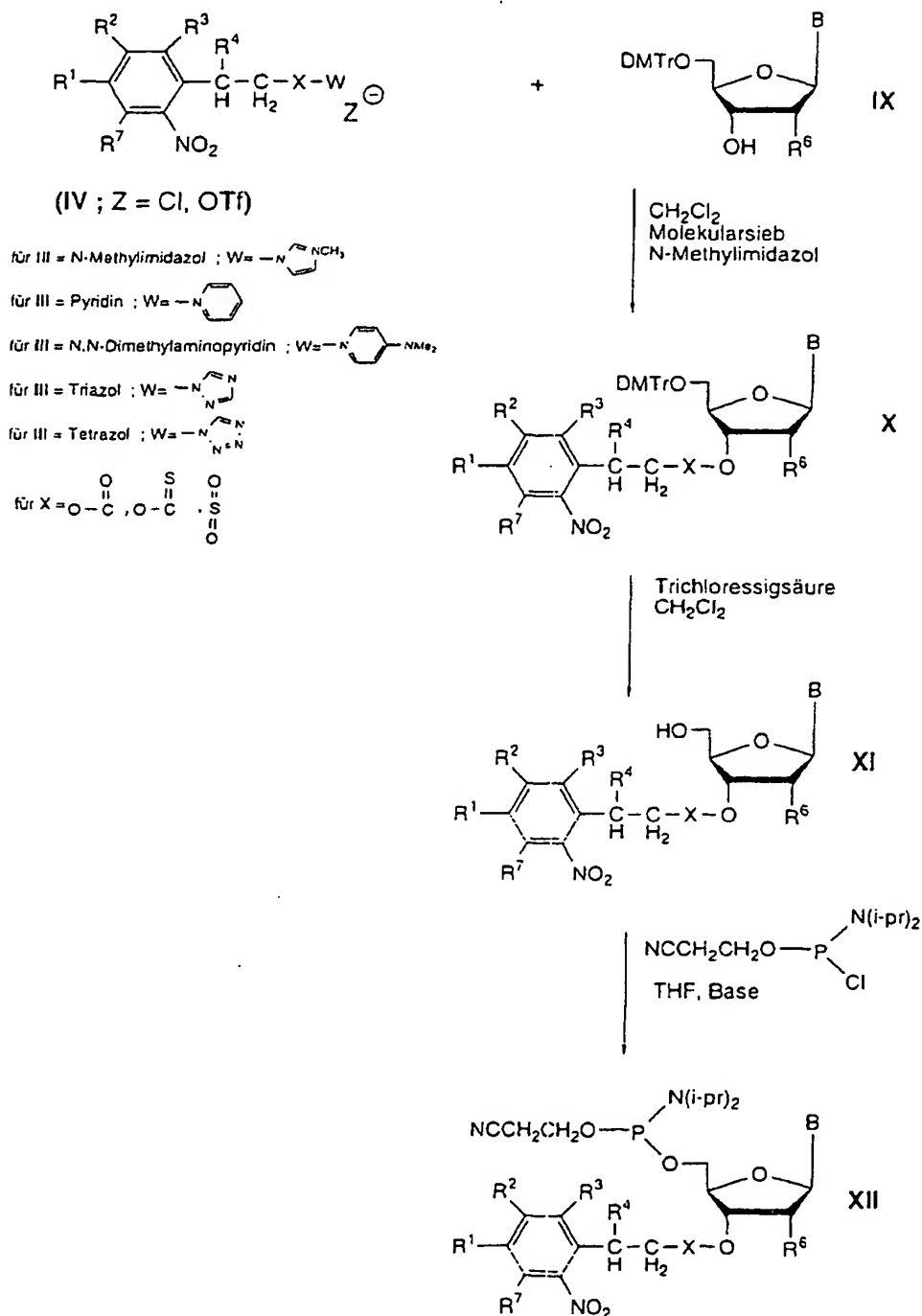
Syntheseplan : Umsetzung des Acylierungsreagenzes

Fig. 2

**Beispiele :**

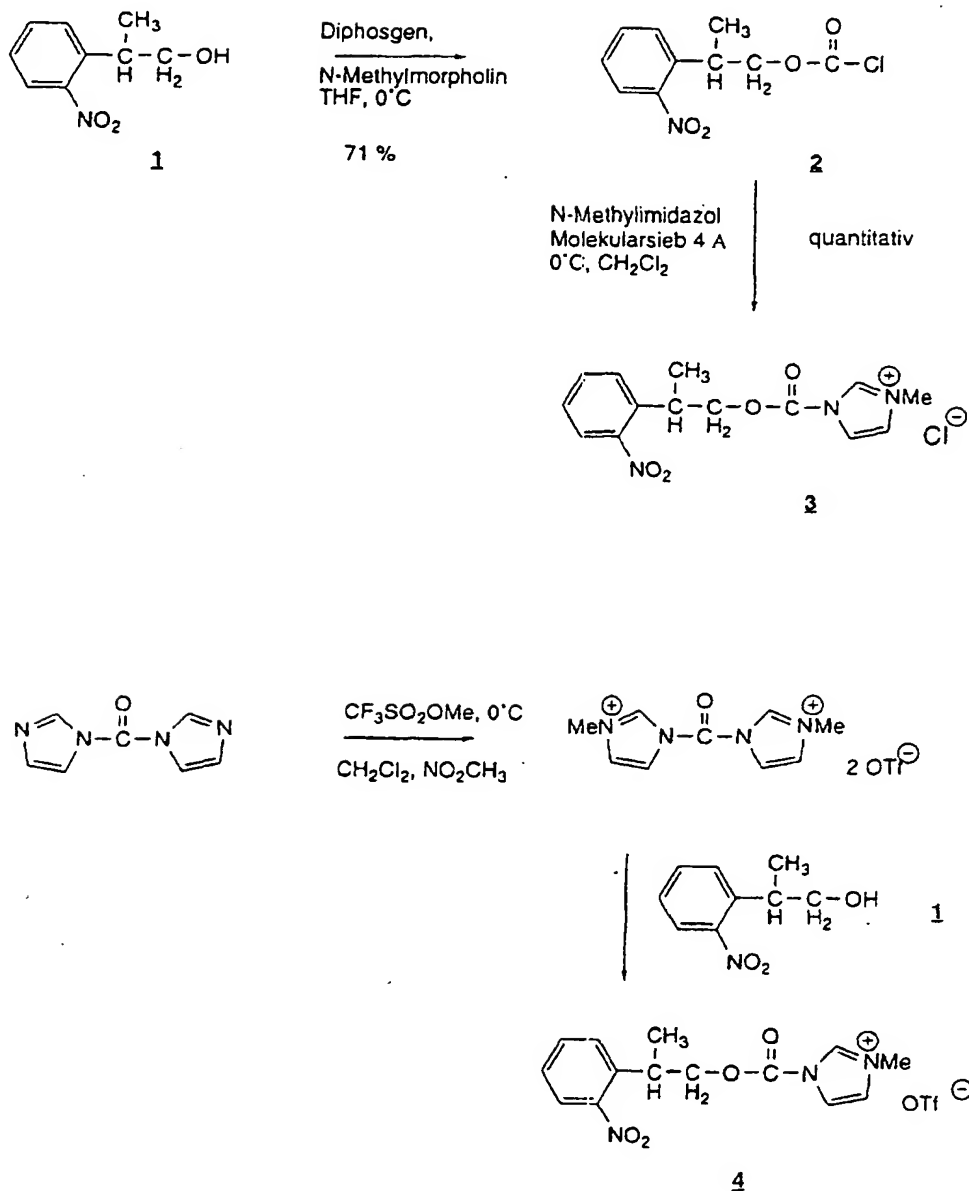


Fig. 3

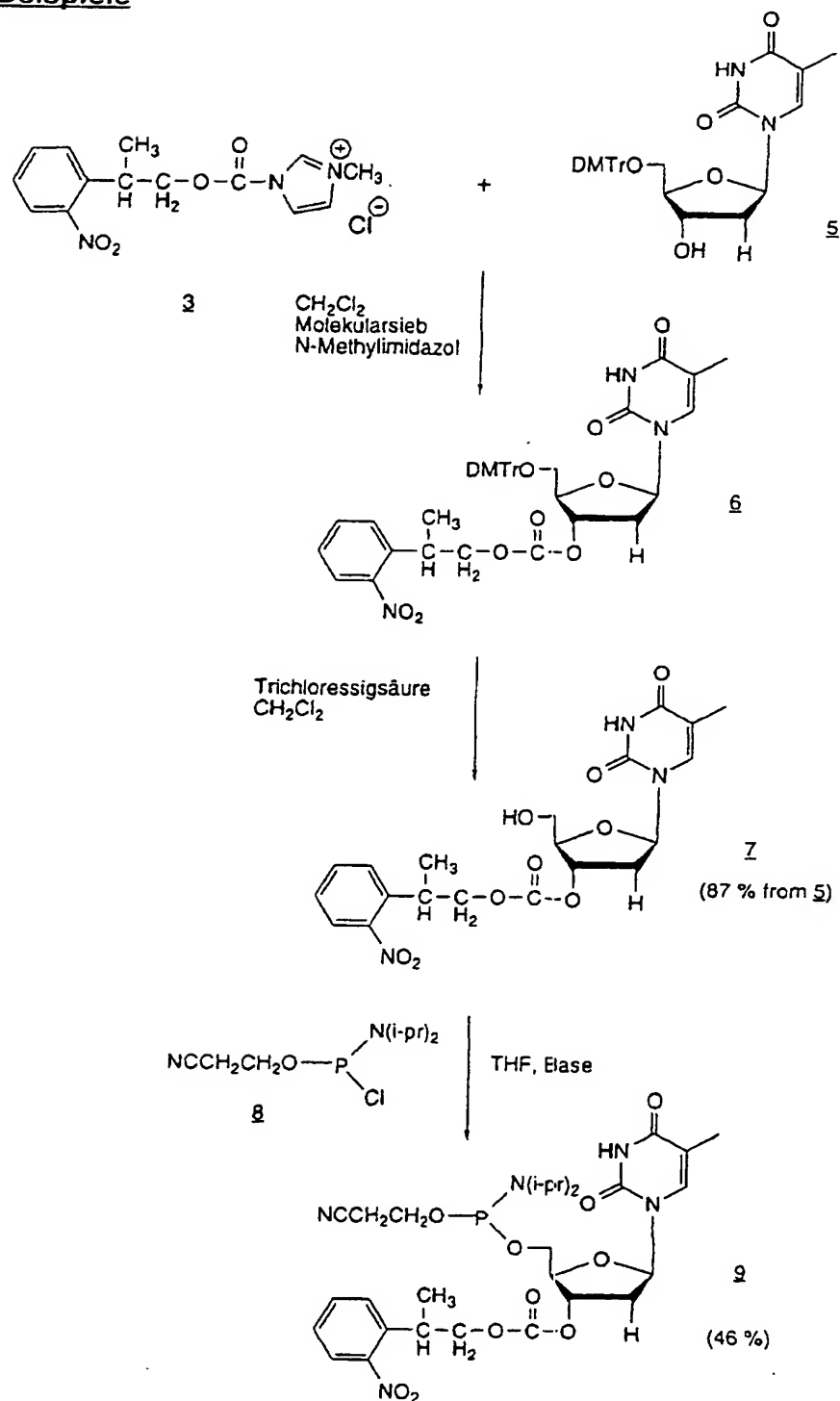
**Beispiele**

Fig. 4

## Beispiele

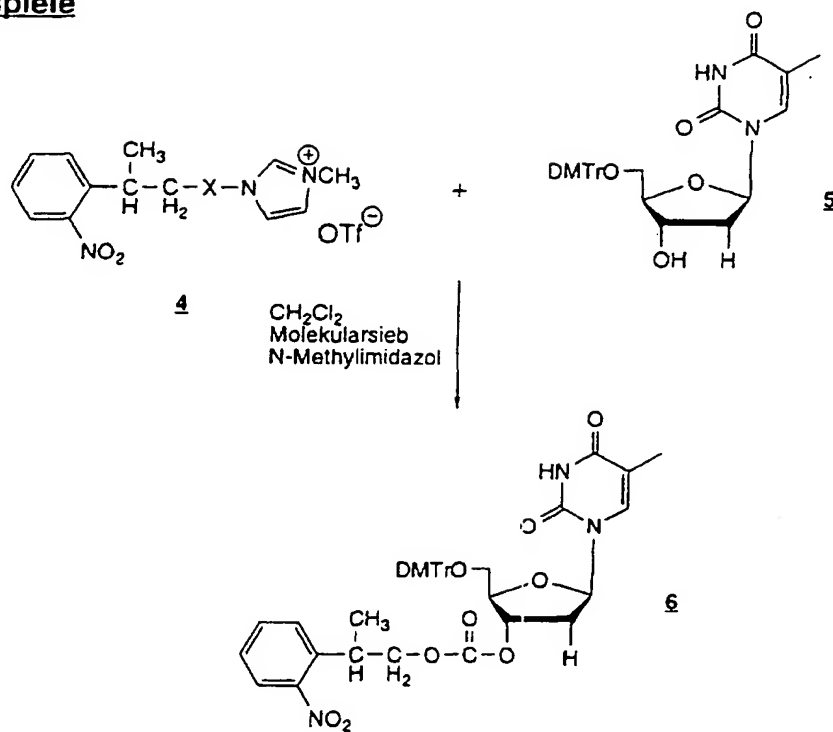


Fig. 5

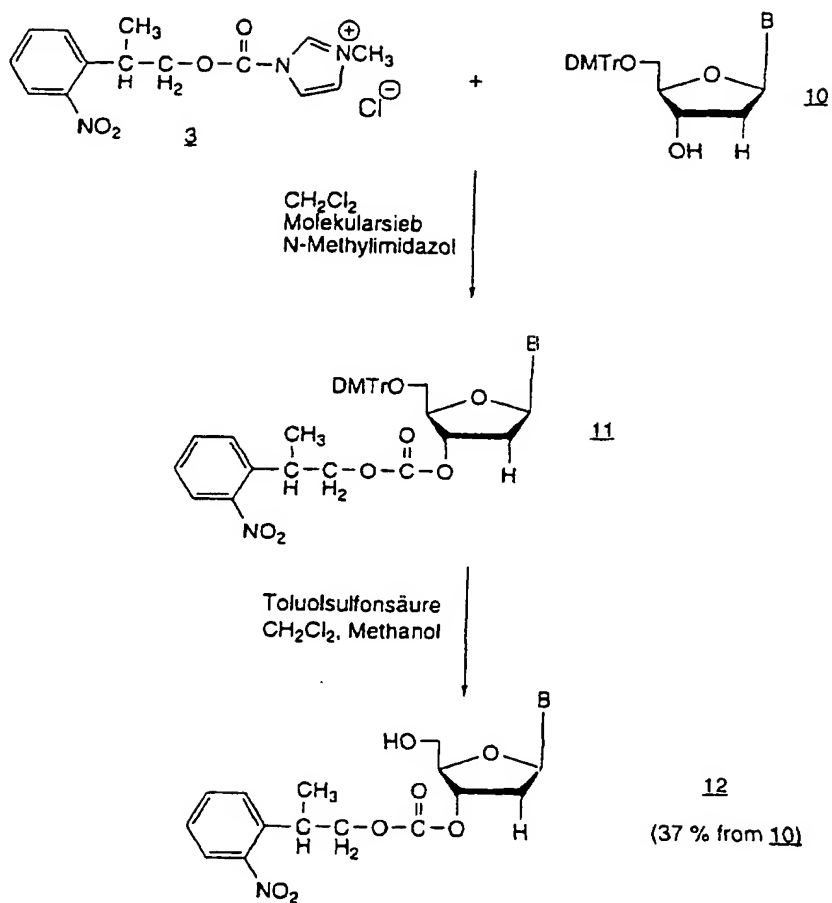
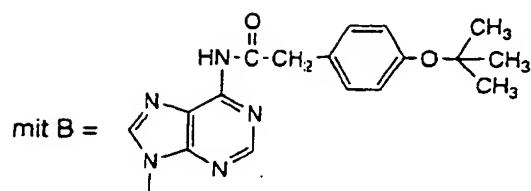
**Beispiele**

Fig. 6



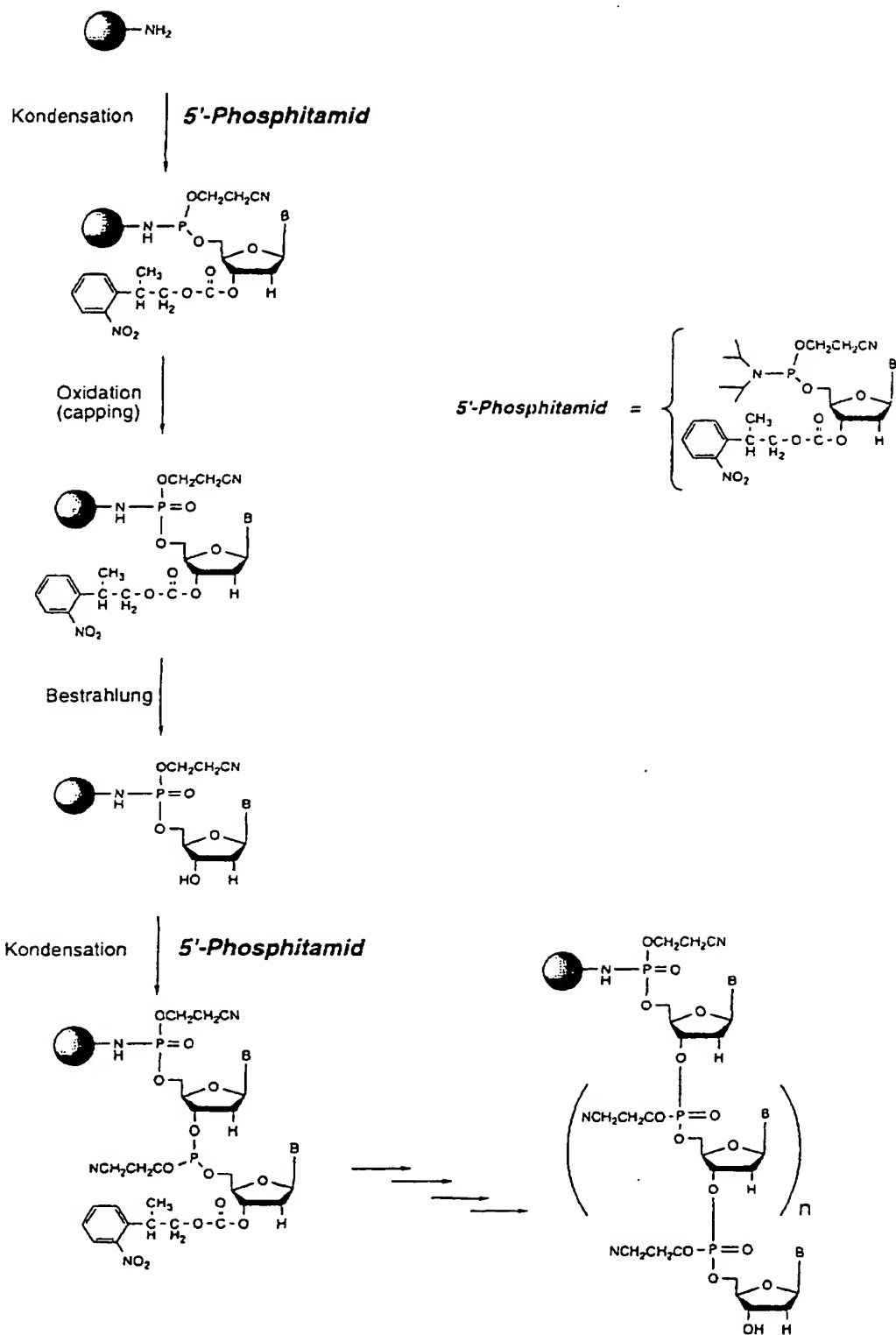


Fig. 7

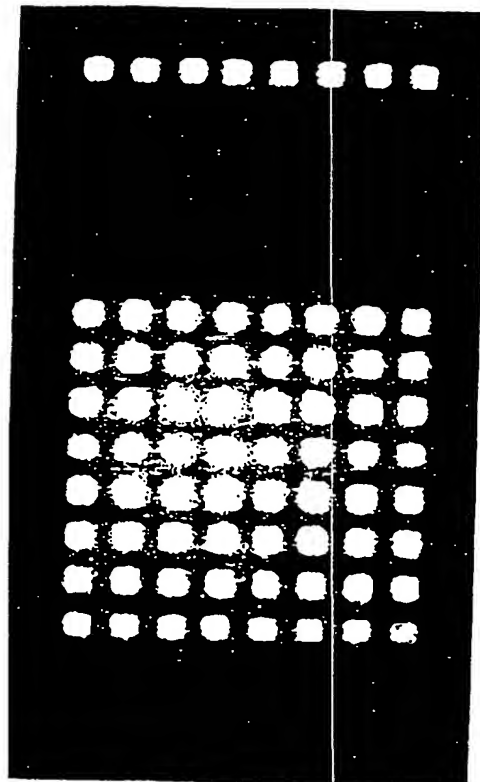


Fig. 8

BEST AVAILABLE COPY

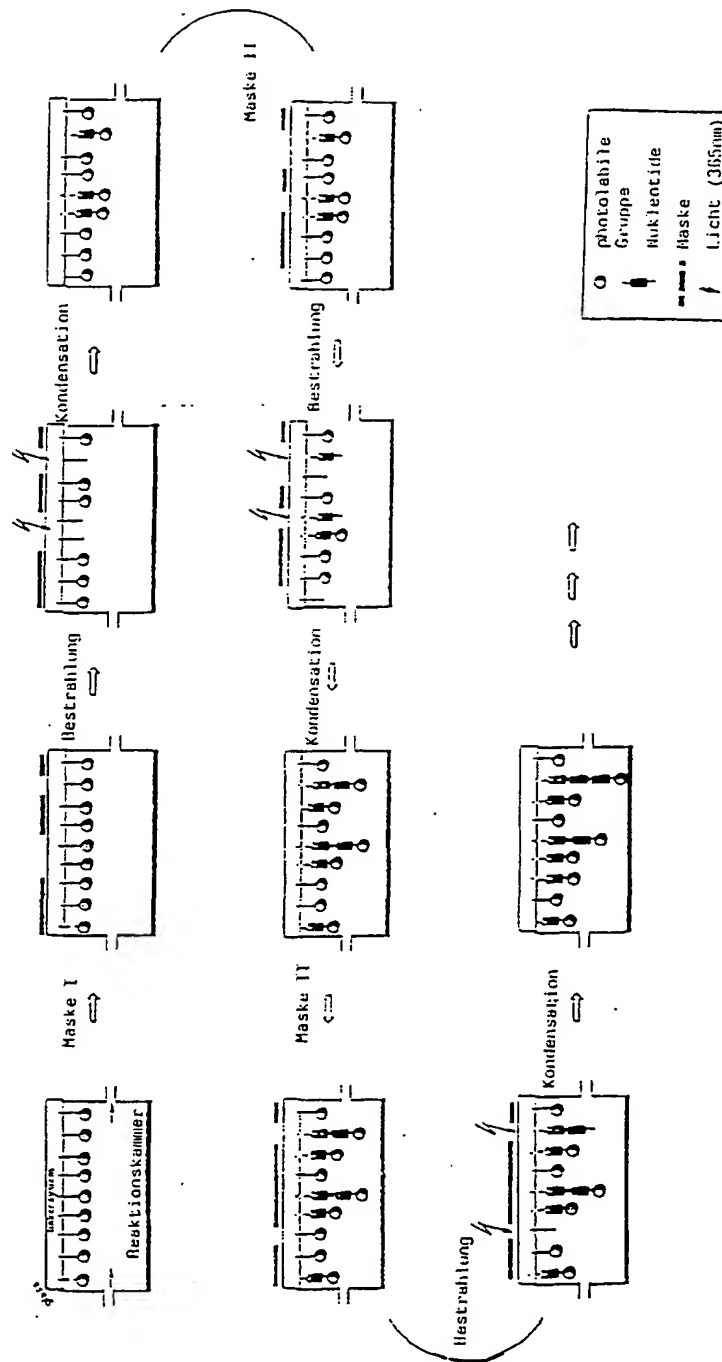


Fig. 9